

---

## INOCULACIÓN DE *Coccidioides immitis* STILES 1896 AL EMBRION DEL POLLO

---

ANTONIO GONZALEZ OCHOA y ROBERTO  
MARCOR MORA.  
Laboratorio de Micología.  
Instituto de Salubridad y Enfermedades  
Tropicales.

Existiendo el conocimiento de que el embrión de pollo es un medio de cultivo de gran valor para el estudio de organismos que necesitan requerimientos especiales para su desarrollo, sobre todo presencia de tejidos vivos, este medio se introdujo al campo de la micología desde que Moore (1941) hizo los primeros estudios sobre el desarrollo de diversos mohos y levaduras patógenas.

Tomando en cuenta que la mayoría de los hongos de interés médico presentan aspectos morfológicos diferentes cuando se encuentran parasitando al huésped o cuando se les cultiva, se ha creído conveniente buscar un medio adecuado, distinto de la inoculación a los animales susceptibles, para obtener la fase parasitaria. El caso del *Coccidioides immitis* que presenta en el cultivo la forma micelial y en estado parasitario la forma esferular, es muy característico al respecto.

No siendo problema el cultivo de la forma micelial, aunque demasiado peligrosa para manipularla por contener los elementos infectantes, se pensó que el embrión de pollo sería un medio adecuado para obtener la forma esferular, ya que los diversos medios de cultivo "in vitro" no satisfacían enteramente esa finalidad (Mae Neal y Taylor 1914, Lack 1938 y Burcke 1951).

Burcke (1950) siguiendo la tendencia de Moore (1941), quien dice haber logrado por primera vez la formación esferular en la inoculación de *C. immitis* al embrión de pollo, consigna un gran desarrollo de esférulas en el embrión inoculado, por cualquier vía, con clamidosporas y artrosporas de *C. immitis*.

Brueck y Budding (1901) dicen también que obtuvieron un gran desarrollo de esférulas en el saco vitelino inoculando micelio, aunque sugieren debería aclararse esta transformación.

Teniendo como base los trabajos anteriores, nos propusimos estudiar la producción de la fase esferular de *C. immitis* en embrión de pollo, ya que al decir de los autores mencionados era un recurso que daba resultados constantes. Con esa finalidad nos concretamos a buscar la vía de inoculación que diera un mayor número de esférulas, así como a identificar los artificios o elementos celulares del embrión normal, que pudieran confundirse con las verdaderas esférulas. Una vez terminados los estudios mencionados, éstos nos servirían de base para la exploración de sustancias fungistáticas, pensando que la búsqueda de drogas para luchar contra la infección de *C. immitis* debería hacerse más bien sobre la fase esferular que sobre la filamentosa, ya que la primera es la que adopta el hongo en los tejidos que infecta, y la que posiblemente presente diferencias de susceptibilidad con relación a la fase filamentosa.

Todo lo anterior fue probado paralelamente con sus correspondientes controles, es decir, con embriones no inoculados, y al hacer las observaciones, encontramos formas esferulares tan semejantes en los controles y en los inoculados, que prácticamente son indiferenciables de las que los autores mencionados tomaron como verdaderas esférulas de *C. immitis*. Este hecho nos sugirió la duda sobre la supuesta formación de esférulas en el embrión de pollo por inoculación de la fase filamentosa, por lo que nos propusimos aclarar esta situación, lo que constituye la finalidad del trabajo.

### MATERIAL Y METODO

a) *Cepas*. Empleamos en un principio varias cepas de *C. immitis*, las catalogadas con los números 522, 527, 528, 529, existentes en la micoteca del I.S.E.T. tres de ellas con los números 527, 528, 529, fueron aisladas en el país, la 522 se obtuvo de la micoteca de la Universidad de Duke bajo el número 316. Posteriormente utilizamos solo la número 527 por ser la más recientemente aislada; esta cepa se obtuvo de un caso de Coccidioidomicosis

autóctono, del poblado de Apatzingán, Michoacán, por Peres (1952) cepa que fue identificada en el Instituto de Sal. y Enf. Trops.

b) *Huevos embrionados y vías de inoculación.* Se emplearon huevos embrionados, a los que previamente se les checaba su vitalidad, de diversos tiempos de incubación en relación con las vías seguidas para su inoculación. Para la inoculación en saco vitelino se tomaron embriones de seis días y se siguió la técnica propuesta por Goodpasture y Buddingh (1948). Cuando se inocularon en membrana corioalantoidea seguimos la técnica propuesta por Goodpasture (1933), con embriones de 10 y 15 días de incubación. El material anterior se dividió en 5 lotes; en los 3 primeros el inoculum consistió en clamidosporas y artrosporas, y en los otros dos se inocularon esférulas obtenidas del pus de testículos de cuy, cuidando que los testículos no se hubieran fistulizado para obtenerlas en condiciones de esterilidad.

Los embriones inoculados e incubados a una temperatura de 37.5° C. y con una humedad aproximada de 50%, fueron diariamente observados al ovoscopio; los que se encontraban muertos eran sacados del cascarón haciendo un casquete en la cámara de aire con taladro de dentista, y se observaba si había crecimiento micelial; acto seguido se vaciaba el contenido del huevo en cajas de Petri estériles y se buscaban de esférulas por medio de las técnicas ordinarias. En el caso de la inoculación en la membrana corioalantoidea se precisaba la existencia o no del micelio en la cámara de aire, se cerraba el casquete con colodión y se habría una porción del cascarón, según indica Goodpasture (1933) para esta clase de inoculaciones, para enseguida observar la membrana corioalantoidea por lo que respecta a la existencia de esférulas o micelio.

## RESULTADOS

I. *Inoculación de la fase micelial al embrión de pollo.* Como se hizo mención en la parte correspondiente a material y método, los embriones inoculados se agruparon en 5 lotes haciendo un total de 151 huevos. Los resultados que se sintetizan en los cuadros correspondientes, mostraron una disparidad con los obtenidos por los autores a que hicimos referencia en la introducción de este trabajo.

*Lote núm. 1.* Comprendió un total de 53 huevos embrionados que fueron inoculados en el saco vitelino con artrosporas y clamidosporas. El promedio de supervivencia fue de 3 días aproximadamente, el máximo fue de 10 días como se puede ver en el cuadro núm. 1. En el 73.4% se encontró micelio en el saco aéreo; pero en ninguno se pudieron observar esférulas verdaderas, ya que las formaciones que semejaban esférulas, y que probablemente son sustancias nutritivas o elementos celulares del embrión, tal vez células mesodérmicas de los islotes sanguíneos, se encontraron también en los embriones testigos, es decir, sin inocular. Estas formaciones que denominaremos "falsas esférulas" se observan en huevos no inoculados (de 1 a 12 días de incubación) los que, como se puede apreciar en las fotos de este trabajo, presentan diferente morfología en relación con el método de observación, pero de todas maneras adoptan aspectos tan semejantes a las esférulas verdaderas que se explica fácilmente su confusión.

CUADRO NÚM. 1.

RESULTADOS DE LA INOCULACION DE FASE MICELIAL DE *C. immitis*, EN SACO VITELINO, EN RELACION CON LA SUPERVIVENCIA DEL EMBRION

Supervivencia en días	No. de huevos	Micelio en saco aéreo	RESULTADOS	
			Esférulas	Negativos
1	4	0	0	4
2	6	5*	0	1
3	10	8	0	2
5	8	5	0	3
6	5	4	0	1
7	8	7	0	1
8	1	1	0	0
10	1	1	0	0

Nacieron	2	0	0	2
Total	53	39	0	14

Micelio en saco aéreo .....	73.4 %
Esférulas .....	0.0 %
Sin desarrollo .....	26.6%

\* Observación hecha dos días después de muerto el embrión.

En el saco vitelino las "falsas esférulas" toman el aspecto de células redondeadas con tamaños variables, desde 8 a 250 micras, algunas provistas de doble contorno, o una membrana, aproximadamente de 1 micra de espesor; en el interior hay una estructura granular que semeja endosporas, aunque diferenciándose de las auténticas endosporas por su tamaño y disposición, ya que estas formaciones son en general más pequeñas, o de tamaño variable, o las supuestas endosporas no presentan la posición ordinaria de las endosporas verdaderas. Vistas al examen directo con Lugol (fig. 1), parecerían esférulas jóvenes en las que no se hubiera formado la vacuola central y en las que el citoplasma multinucleado aun no principia a mostrar condensaciones. Al observar el producto embrionario después de concentrado y teñido por el azul algodón sudán III al lactofenol, la semejanza de las "falsas esférulas" con las verdaderas es aún mayor, ya que el doble contorno o el espesor de la membrana son más claros (figs. 2 y 3), y los elementos semejan endosporas, así como las vacuolas que las delimitan, son más definidas dando imágenes en realidad muy parecidas a una *auténtica esférula* madura de *C. immitis* (figs. 4 y 5).

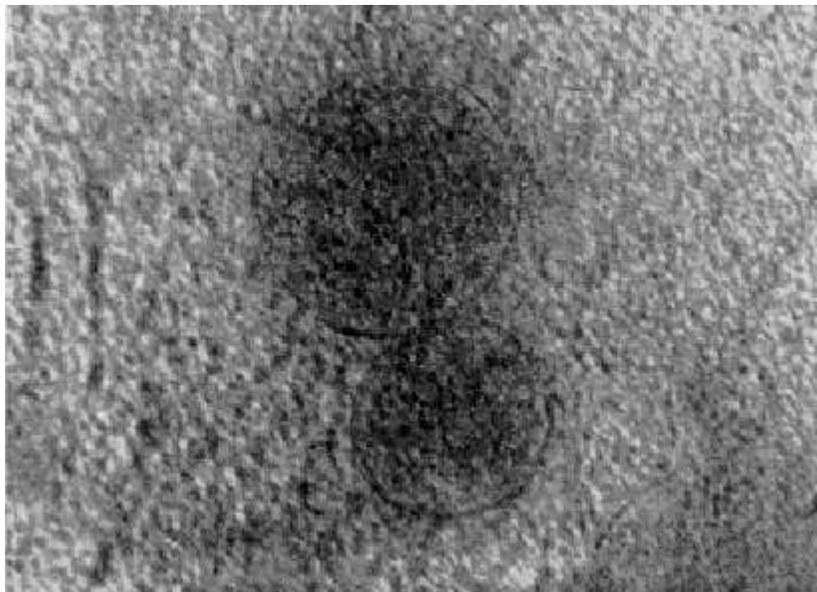


Fig. 1. "Falsas esférulas" que semejan esférulas jóvenes de *C. Immitis*, vistas en Lugol.

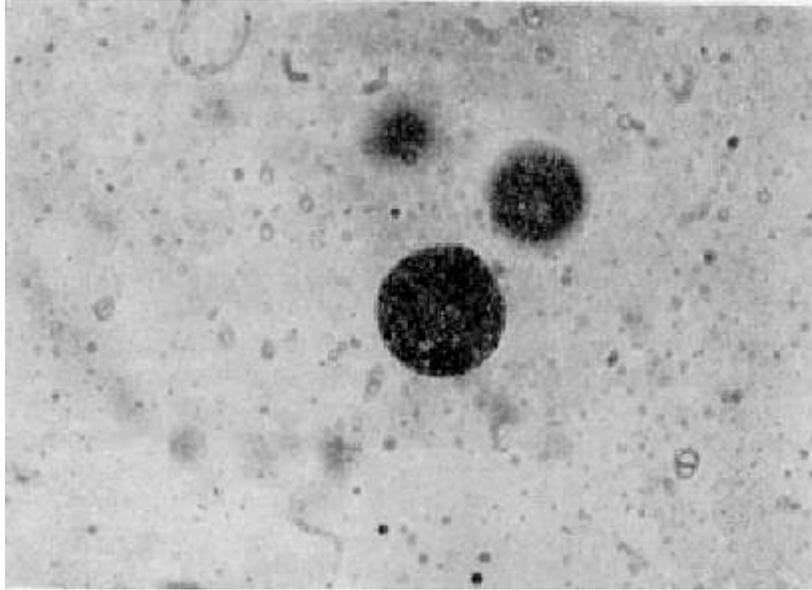


Fig. 2. "Falsas esférulas" teñidas con azul-algodón-sudán III-Lactofenol

Se observan, además, en los embriones testigos, unas formaciones amiboideas o estrelladas, que fueron consideradas por Durcke (1951) como esférulas propias de *C. immitis* en el huevo embrionado (fig. 6). Las gotas de grasa de los huevos embrionados son fácilmente diferenciables de las esférulas verdaderas y de las "falsas esférulas", puesto que el azul algodón sudán III al lactofenol las tiñe uniformemente de un color rojoranja, mientras que las "falsas esférulas" toman un color azul. Al examen directo con el cloral lactofenol de Amman no se observaron formas tan sugestivas de esférulas, como en los anteriores procedimientos.

La formación de micelio en el saco aéreo es evidente; al abrir los cascarones se advierte desarrollo algodonoso como se puede ver en la figura 7. Hay casos, por otra parte, en que nada más se ve una película blanquecina; en un principio supusimos sería de un desarrollo pobre de micelio, pero como pudo ser observado igualmente en los huevos sin inocular, la tomamos como una formación tisular propia del embrión. La observación del micelio verdadero (fig. 8A), y la de estas formaciones tisulares (fig. 8B), pueden dar lugar a confusión; aunque observándolas cuidadosamente se advierte que en el micelio verdadero los filamentos tienen un diámetro de 2 a 3 micras, viéndose además tabicados, con artrosporas y raras clamidosporas, mientras que las aparentes hifas de las formaciones tisulares son más delgadas, de un grosor uniforme.

*Lote núm. 2.* Como se observa en el cuadro núm. 2, en este lote la inoculación fue hecha en la membrana corioalantoidea con artrosporas y clamidosporas de *C. immitis*, dando un 43.4% de desarrollo de micelio en el saco aéreo. En el total de 55 huevos inoculados por esta vía, obtuvimos un promedio de 3 días de supervivencia aproximadamente, y un máximo de 11 días. El desarrollo de micelio en el saco aéreo fue menor con relación al por ciento del lote anterior, probablemente debido a que esta vía es menos adecuada para su crecimiento, por tardar más en pasar de la membrana corioalantoidea a la membrana del saco aéreo, ya que se notó que al dejar los embriones un período de tiempo mayor, y a la temperatura ambiente, el desarrollo de micelio en el saco aéreo se hacía aún después de unos dos días de muertos.

La investigación de las esférulas se hizo empleando las mismas técnicas que en el lote anterior, sin haberlas observado en ninguno de los embriones de este lote; por el contrario las "falsas esférulas" eran constantes como en los huevos sin inocular. Cuando se notó alguna alteración en la membrana corioalantoidea se practicaron cortes histológicos; en 3 casos que advertimos dicha alteración el corte histológico mostró focos de proliferación vascular con dilatación de los vasos neoformados y algunos macrófagos espumosos, encontrándose en dichos focos filamentos micelianos escasos, no hallándose formas esféricas.

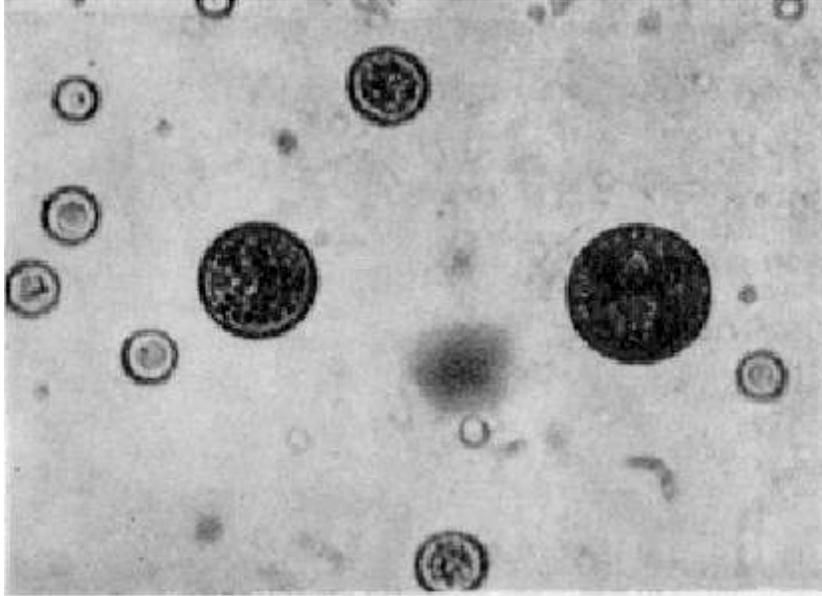


Fig. 3. "Falsas esférulas" en que su contenido parecería mostrar endosporas.

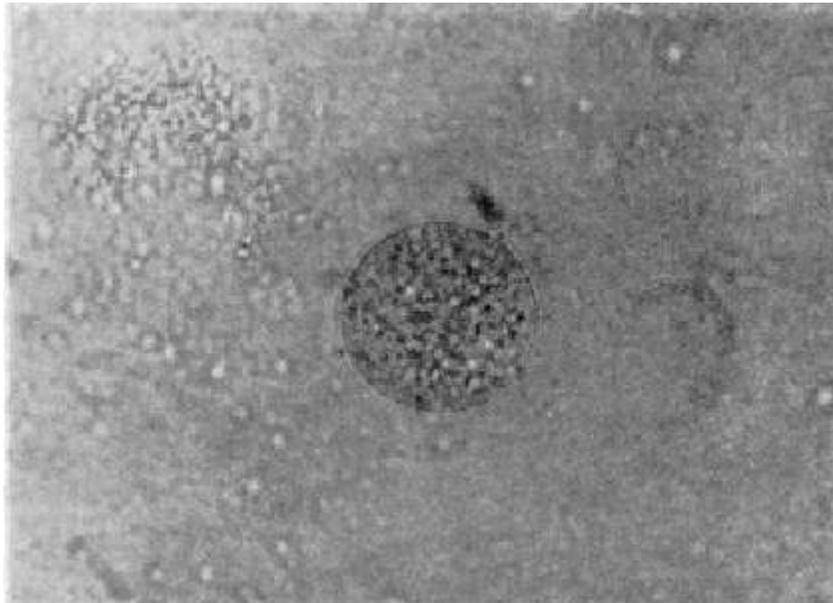


Fig. 4. Auténtica esférula de *C. immitis* mostrando claramente su doble membrana y sus endosporas

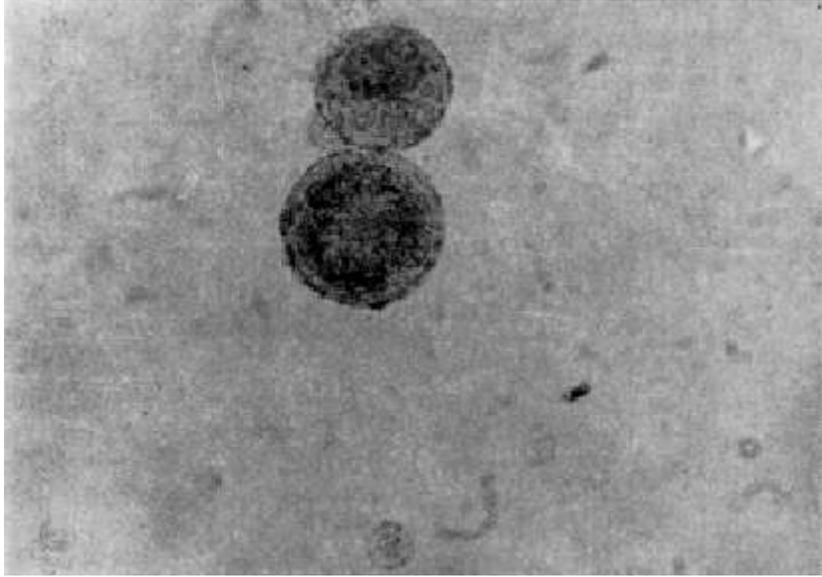


Fig. 5. Auténticas esférulas de *C. immitis*

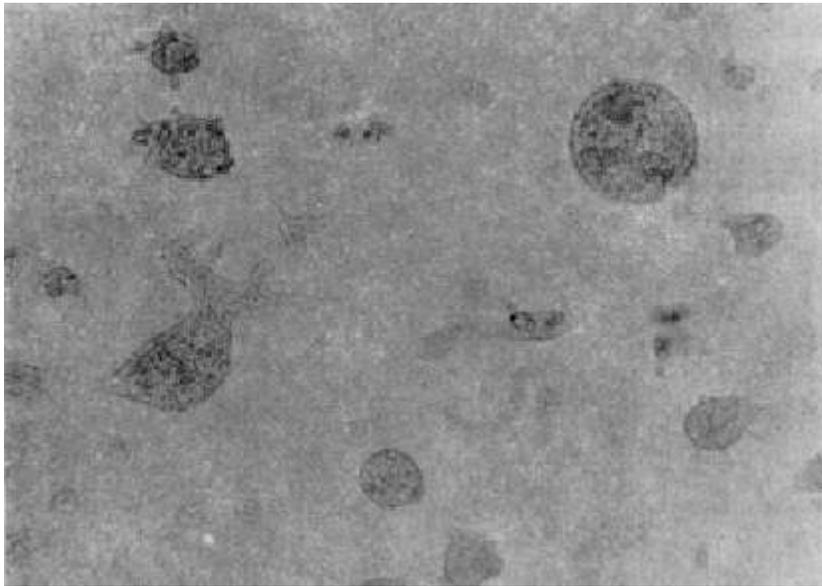


Fig. 6. "Falsas esférulas" entre las que se verían las de tipo amiboideo o en forma de estrella

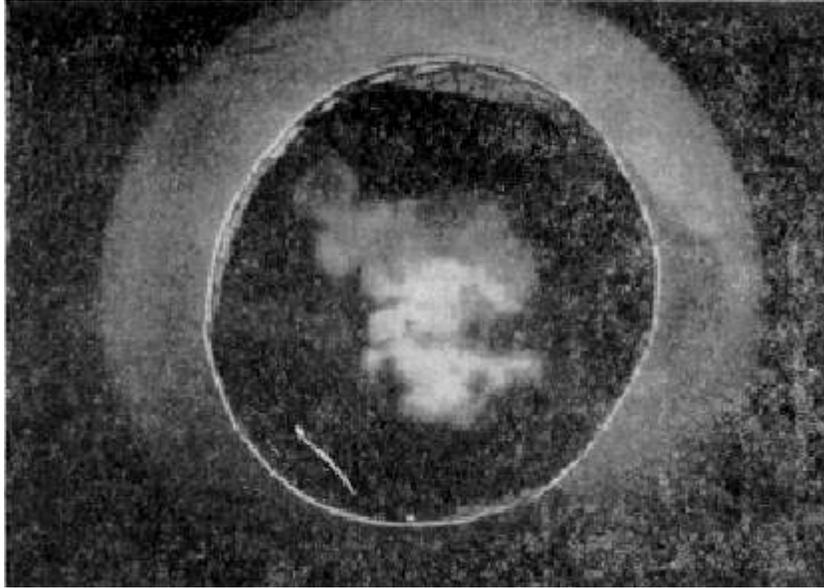


Fig. 7 Desarrollo filamentososo en el embrión de pollo.

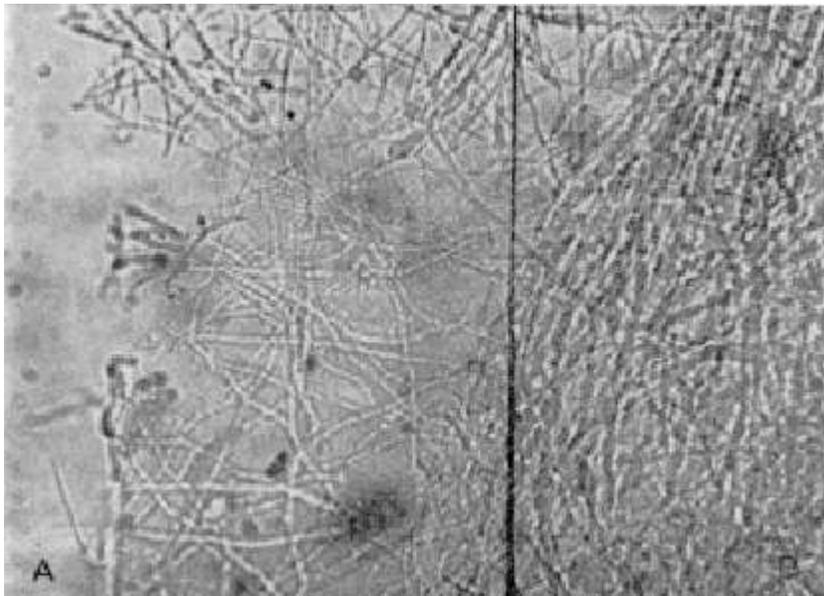


Fig. 8. Micelio verdadero "A". Formación semejando micelio "B".

#### CUADRO NÚM. 2

RESULTADOS DE LA INOCULACION DE FASE MICELIAL DE *C. immitis* EN LA MEMBRANA CORIOALANTOIDEA, EN RELACION CON LA SUPERVIVENCIA DEL EMBRION

Supervivencia en días	No. de huevos	Micelio en saco aéreo	RESULTADOS	
			Esférulas	Negativos
1	9	4*	0	5
2	9	5*	0	4
3	10	4	0	6
4	9	4	0	5
5	5	2	0	3
6	3	1	0	2
7	5	3	0	2
8	1	1	0	0
10	2	0	0	2
11	1	0	0	1
Nació	1	0	0	1
Total	55	24	0	31

Micelio en saco aéreo ..... 43.4 %  
Esférulas ..... 0.0 %  
Sin desarrollo ..... 56.6%

\* Observación hecha dos días después de muerto el embrión.

*Lote núm. 3.* La inoculación fue hecha en la membrana corioalantoidea pero en embriones de 15 días; el total de los huevos inoculados fue de 19, de los cuales 4 murieron a los 6 días de inoculados y dos de éstos mostraron micelio en la membrana corioalantoidea.

Los 15 restantes nacieron sin que hubieran mostrado anomalía ostensible, y sin que hubiera signo de desarrollo micelial en el animal o en los restos del huevo. Datos recopilados en el cuadro núm. 3.

#### II. Inoculación de la fase esférica al embrión de pollo.

*Lote núm. 4.* Existiendo ya la duda de que la fase esférica pudiera desarrollarse en el embrión de pollo, se pensó inclusive en que no sería un medio adecuado para que subsistieran las esféricas; con esta finalidad se inocularon esféricas estérilmente obtenidas del pus de testículos de cuy, previamente infectados con artrosporas y clamidosporas de *C. immitis*; la vía de inoculación fue la del saco vitelino empleando un total de 18 embriones de pollo de 6 días de incubación. El promedio de supervivencia fue de 7 días. En sólo 2 de estos 18 embriones encontramos esféricas verdaderas juntamente con el desarrollo micelial, éstas fueron claramente diferenciadas de las "falsas esféricas". En todos los embriones menos uno, hubo desarrollo micelial apreciado a la simple vista y checado al microscopio (cuadro núm. 4). Prácticamente en la mitad el micelio apareció hasta después de muerto el embrión, lo que se observó volviendo a cerrar el casquete de los huevos negativos y abriéndolos de nuevo dos días después.

CUADRO NÚM. 3.

RESULTADOS DE LA INOCULACION DE FASE MICELIAL DE *C. immitis*, EN LA MEMBRANA CORIOALANTOIDEA, EN RELACION CON LA SUPERVIVENCIA DEL EMBRION.

Supervivencia en días	No. de huevos	Micelio en saco aéreo	RESULTADOS	
			Esférulas	Negativos
6	4	2	0	2
Nacieron	15	0	0	15

Total	19	2	0	17
-------	----	---	---	----

*Lote núm. 5.* Se inocularon 6 embriones de 10 días de incubados, en la membrana corioalantoidea y el inoculum consistió en una suspensión de esférulas, de la misma manera que en el lote anterior. Los resultados (cuadro núm. 5) en este caso dieron un promedio de supervivencia de dos días y un máximo de nueve días; ninguno mostró esférulas a no ser las "falsas esférulas"; en 4 hubo desarrollo de micelio en el saco aéreo, en las condiciones del lote anterior; dos de los embriones dieron resultados negativos.

#### DISCUSION

Como se hizo mención al tratar la finalidad de este trabajo, nos habíamos propuesto estudiar substancias fungicidas en relación con la fase esférular de *C. immitis*. Las ideas reinantes acerca de la facilidad de obtener la fase esférular de ese hongo, por inoculación de artrosporas y clamidosporas, en el embrión de pollo (Moore, Burcke, Brueck y Buddingh) haría practicable el estudio proyectado. En el plan de trabajo que nos habíamos señalado, el primer punto era familiarizarnos con las técnicas propuestas por los mencionados autores para evitar al máximo muertes ajenas de los embriones, así como conocer los distintos aspectos que las esférulas pudieran presentar en los diferentes estadios evolutivos del embrión de pollo.

#### CUADROS NÚMS. 4 y 5.

#### RESULTADOS DE LA INOCULACION DE ESFERULAS DE *C. immitis*, EN EL SACO VITELINO Y MEMBRANA CORIOALANTOIDEA, EN RELACION CON LA SUPERVIVENCIA DEL EMBRION.

SACO VITELINO				
Supervivencia en días	No. de huevos	Micelio en saco aéreo	RESULTADOS	
			Esférulas	Negativos
1	6	6	0	0
2	2	2	0	0
6	3	3	0	0
7	7	6	2	1
Total	18	17	2	1

MEMBRANA CORIOALANTOIDEA				
Supervivencia en días	No. de huevos	Micelio en saco aéreo	RESULTADOS	
			Esférulas	Negativos
2	1	0	0	1
2	2	1	0	1
3	1	1	0	0
7	1	1	0	0
9	1	1	0	0
Total	6	4	0	2

Iniciando el trabajo, con sus respectivos controles, nos dimos cuenta que la confusión era bastante grande por lo que respecta a la identificación de las esférulas, puesto que en los embriones sin inocular

había formas muy semejantes a las señaladas como esférulas por los autores mencionados. Ahondando más el problema llegamos a concluir que lo descrito como desarrollo esferular no correspondía sino a formaciones normales del embrión, ya que los testigos las presentaban constantemente; a estas formaciones, semejantes a las esférulas, son las que hemos denominado “falsas esférulas”.

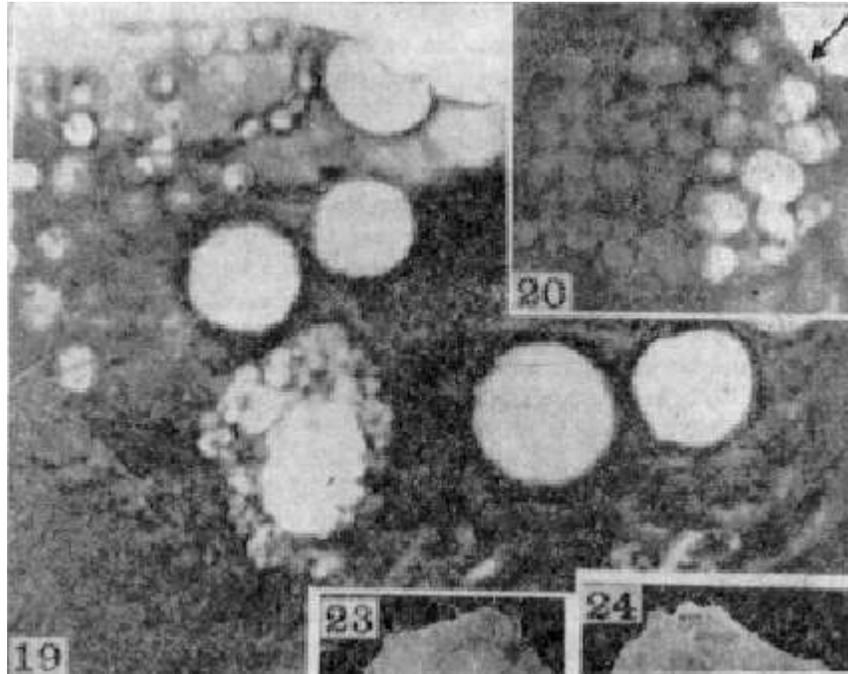


Fig. 9. Reproducción de las Fotos. De Moore con que ilustra la formación de esférulas, y que corresponden a “falsas esférulas”.

Aunque es posible hacer una diferenciación entre las verdaderas esférulas y las “falsas”, en realidad existe una gran semejanza, como se puede apreciar al hacer la comparación de la fotografía reproducida de Moore (fig. 9) que el autor considera como de una esférula, y las “falsas esférulas” que observamos en examen directo en fresco con Lugol (fig. 1), y las correspondientes a las esférulas vistas en las mismas condiciones.

Las “falsas esférulas” probablemente corresponden a sustancias nutritivas, o a elementos de los llamados islotes sanguíneos, que según Patton (1946) estarían constituidos por células redondeadas agrupadas en racimos, en íntimo contacto con el endodermo y el saco vitelino.

Por lo que respecta a la producción de la fase esferular de *C. immitis* podemos concluir, que el embrión de pollo no es un medio apropiado para su obtención a partir de artrosporas y clamidosporas, ni siquiera para su conservación, ya que la inoculación de esférulas al mismo embrión, tomadas del pus de testículos de cuy, demuestra que no continúa el desarrollo de esta fase, como en el tejido vivo humano y de animales susceptibles, sino que pronto se genera la fase micelial.

El embrión de pollo en todo caso sería un medio para el crecimiento de la fase micelial, ya sea por inoculación de esférulas o bien por inoculación de artrosporas y clamidosporas, preferentemente cuando está privado de vida, ya que en los casos en que murieron a las 24 hs., dejándoles un tiempo mayor, a la temperatura ambiente, el desarrollo micelial se hizo más abundante y característico (fig. 7). El tiempo de supervivencia de los embriones fue suficiente para que se hubiera llevado a cabo la transformación de las artrosporas y clamidosporas a esférulas,

puesto que la inoculación de la fase micelial al testículo de cuy mostró esférulas en los cortes histológicos, a las 72 hs. y, por examen directo del concentrado de la supuración testicular, aparecieron a los 6 días. En los embriones observados el máximo de supervivencia fue de 11 días, y algunos inclusive llegaron a nacer.

Para asegurarnos de que la técnica de inoculación al embrión fue correcta, inoculamos micelio de *Blastomyces dermatitidis* al saco vitelino habiendo observado la fase levaduriforme a los 12 días de inoculado.

En un 90% de los 151 huevos inoculados se recuperó la cepa en medio de Sabouraud, al resembrar de los diversos sitios donde se suponía podrían existir las esférulas.

Agradecemos la valiosa colaboración prestada por el Dr. M. Martínez Báez, Jefe del Laboratorio de Anatomía Patológica del I.S.E.T, en los estudios histopatológicos de los embriones de pollo y testículos de cuy, inoculados con *C. immitis*.

NOTA: Habiéndose terminado el presente trabajo nos enteramos de la publicación de Newcomer, Wright and Tamblin, J. Infect. Dis. 90:258-266, 1952, en la que se señala, al igual que en nuestro trabajo, que no encontraron desarrollo esferular en huevos embrionados inoculados con micelio de *C. immitis*, y que las formas vistas por otros autores no son sino agregados de sustancias nutritivas del embrión.

## RESUMEN

Se presenta un trabajo sobre inoculación de *C. immitis* al embrión de pollo, realizado con un total de 151 huevos, inoculados en el saco vitelino y la membrana corioalantoidea. De acuerdo con la vía seguida y la naturaleza del inoculum, se constituyeron 5 lotes. En los 3 primeros la inoculación se hizo con artrosporas y clamidosporas en el saco vitelino y membrana corioalantoidea; los otros dos lotes fueron inoculados con la fase esferular obtenida de testículos de cuy, siguiendo las mismas vías.

Los resultados mostraron que la inoculación de artrosporas y clamidosporas en el embrión de pollo originan la formación de micelio, principalmente en el saco aéreo. La inoculación de esférulas dio por resultado desarrollo micelial.

Como estudio complementario en la ejecución de este trabajo observamos que 72 horas fueron suficientes para la transformación de la fase micelial a la esferular en el testículo de cuy.

## REFERENCIAS

- BRUECK, J. W. Y BUDDINGH, G. J. 1951. Propagation of Pathogenic fungi in the yolk sac of embryonated eggs". Proc. Soc. Exper. Biol. and Med. 76:258-261.
- BURCKE, R. C. 1950. "Coccidioidomycosis". Tr. New York Acad. Sc. 2:188-194.
- 1951. "In vitro cultivation of the paracithic phase of *Coccidioides immitis*". Proc. Soc. Exper. Biol. and Med. 76:332-335.
- GOODPASTURE, E. W. 1933. "Uses of the chick embryo". South. Med. Jour. 26:418.
- y BUDDINGH, G. J. 1948. Tomado de Rivers "Viral and Rickettsial infections of man" 97-113.
- LACK, A. R., 1938. "Spherule formation and andosporulation of the fungus *Coccidioides* in vitro". Proc. Soc. Exp. Biol. and Med. 38:907-909.
- MOORE, M. 1941. "The Chorio-allantoic membrane of the developing chick as a medium for the cultivation and Histopathologic study of pathogenic fungi" An. Jour Path. 17: 103.
- PATTEN. 1946. "The early Embryology of chick" Blakiston Company Philadelphia-Toronto. 3 ed.: 91-107 pp.